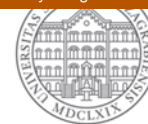




Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**Validacija ispitivanja ukupnog organskog ugljika u
vodama metodom visokotemperaturne katalitičke
oksidacije**

DIPLOMSKI RAD

Ana Ljubić

Zagreb, rujan, 2019.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Agroekologija - agroekologija

Validacija ispitivanja ukupnog organskog ugljika u vodama metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije

DIPLOMSKI RAD

Ana Ljubić

Mentor:

doc. dr. sc. Monika Zovko

Zagreb, rujan, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Ana Ljubić**, JMBAG 0313013437, rođena dana 30.3.1995 u Koprivnici, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

Validacija ispitivanja ukupnog organskog ugljika u vodama metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studenta/ice **Ana Ljubić**, JMBAG 0313013437, naslova

**Validacija ispitivanja ukupnog organskog ugljika u vodama metodom
visokotemperaturne katalitičke oksidacije**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|-------------------------------------|--------|-------|
| 1. | Doc. dr. sc. Monika Zovko | mentor | _____ |
| 2. | Doc. dr. sc. Aleksandra Perčin | član | _____ |
| 3. | Izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković | član | _____ |

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Pregled literature	2
2.1. Prirodna organska tvar	2
2.2. Ukupni organski ugljik (TOC)	3
2.2.1. Koncentracije TOC-a u vodi	3
2.3. Otopljeni organski ugljik (DOC)	4
2.3.1. Koncentracije DOC-a u vodi	5
2.4. Validacija	6
2.4.1. Parametri validacije	7
3. Cilj istraživanja	12
4. Materijali i metode	13
4.1. Priprema uzoraka za DOC	13
4.2. Opis validacijskog pokusa	16
4.2.1. Preciznost	16
4.2.1.1. Ponovljivost pripreme standarda	16
4.2.2. Istinitost	16
4.2.3. Linearnost	17
4.2.4. Granica detekcije i kvantifikacije	17
4.2.5. Kriteriji prihvatljivosti za određivanje ukupnog organskog ugljika u vodi	17
5. Rezultati i rasprava	18
5.1. Preciznost (ponovljivost i obnovljivost)	18
5.1.1. Ponovljivost mjerenja	18
5.1.2. Ponovljivost pripreme standarda	18
5.1.3. Obnovljivost mjerenja	19
5.2. Istinitost	20
5.3. Linearnost	22
5.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije	23
6. Zaključak	25
7. Literatura	26
ŽIVOTOPIS	28

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Ana Ljubić**, naslova

Validacija ispitivanja ukupnog organskog ugljika u vodama metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije

Voda sadrži različite spojeve, pa tako i spojeve organskog porijekla u koje ubrajamo ukupni organski ugljik (TOC). Stoga, potrebno je odrediti koncentraciju TOC-a u vodi zato što povišene količine TOC-a narušavaju njenu ispravnost i kvalitetu. Da bi odredili koncentracije TOC-a u vodi provode se analize poput visokotemperaturne katalitičke oksidacije, a da bi utvrdili je li ta metoda dobra za određivanje TOC-a, mora se provesti postupak validacije. Validacijom se utvrđuje pouzdanost i točnost provedene metode i njezinih rezultata. U ovom istraživanju uzeti su uzorci sa potoka Bliznec i Divlje vode u kojima je visokotemperaturnom katalitičkom oksidacijom određena koncentracija TOC-a. Postupkom validacije odnosno validacijskim parametrima (preciznost (ponovljivost i obnovljivost), linearnost, granica detekcije i granica kvantifikacije) utvrđeno je da je određivanje TOC-a visokotemperaturnom katalitičkom oksidacijom točno i precizno, isto tako i rezultati metode su pouzdani i točni.

Ključne riječi: Validacija, TOC, validacijski parametri

Summary

Of the master's thesis – student **Ana Ljubić**, entitled

Validation of testing organic carbon in waters by high temperature catalytic oxidation method

Water contains different substances, including compounds of organic origin such as total organic carbon (TOC). Consequently, it is necessary to determine the concentration of TOC in water because the elevated concentrations of TOC disturb water's quality and correctness. For determination TOC concentrations in water, high - temperature catalytic oxidation method is used and to determine that this method is good for TOC determination, procedure of a validation is used. The validation determines the reliability and accuracy of the method and its results. In this research, samples were taken from the streams Bliznec and Divlja voda where the concentration of the TOC in water was determined by high - temperature catalytic oxidation method. The validation and validation parameters (precision (repeatability and reproducibility), linearity, limit of detection and limit of quantification) determine that the determination of TOC by high - temperature catalytic oxidation method is accurate and precise, and the results of the method are reliable and accurate.

Keywords: Validation, TOC, validation parameters

1. Uvod

Voda je vrlo važan čimbenik za sva živa bića jer bez nje ne bi bilo života. Ona sačinjava 70% površine planeta Zemlje i oko 65% našeg tijela, što znači da bi voda za ljudsku potrošnju trebala biti ispravna kako bi se mogla koristiti u te svrhe. Voda sadrži razne spojeve poput minerala, otopljene čvrste tvari, otopljenih plinova i suspendirane tvari koje su anorganskog podrijetla, te spojeve organskog podrijetla kao što je organski ugljik. Osim toga, u uzorcima vode fizikalne i (bio)kemijske promjene odvijaju se različitim intenzitetom i brzinom, što predstavlja veliki izazov u analitičkim ispitivanjima.

Upravo su analitička ispitivanja jedan od temeljnih i neizostavnih alata u upravljanju vodama i planiranju gospodarenja vodama za različite namjene. Analitičkim ispitivanjima voda određujemo stupanj kakvoće voda, mogućnost njihove primjene za različite namjene, planiramo mjere pročišćavanja voda i načine njihove zaštite. Rezultat ispitivanja voda predstavlja glavnu kariku na temelju koje dogovorne ustanove i/ili pojedinci donose odluke koje mogu imati dalekosežne posljedice na zdravlje ljudi i održivost okoliša. Rezultati kemijskih mjerenja i korištene metode moraju biti transparentni i potpuno razumljivi svim korisnicima usluge. Europska Komisija stoga zahtijeva da mjerenja koja se provode u jednoj članici budu prihvatljiva i u svim ostalim zemljama članicama (Zamberlin i sur. 2005.).

Stoga, ne čudi činjenica da se danas tolika važnost pridaje upravo postizanju povjerenja u rezultate ispitivanja. Primjenom propisanih i normiranih postupaka od planiranja uzorkovanja (unaprijed izrađene sheme i kalendara uzorkovanja, vođenje detaljnih terenskih dnevnika, način uzorkovanja), rukovanja uzorcima (obilježavanje uzoraka, transport, skladištenje), odabira ispitnih metoda (osjetljivost metode, granica detekcije i kvantifikacije), odabira referentnih i certificiranih referentnih (kontrolnih uzoraka) do izrade ispitnih izvještaja, laboratoriji povećavaju upravo povjerenje u svoje ispitne rezultate.

U vodama je sve više i više otopljenih organskih spojeva, pa su istraživanja koja se temelje na određivanju tih spojeva sve češća. Jedan od glavnih parametara koji daje kvantitativnu informaciju o ispravnosti i kvaliteti vode je ukupni organski ugljik. S obzirom da su analize i kontrole kvalitete vode sve češće, došlo je do stvaranja mnogo međunarodnih normi, uputa i pravila s analitičkim metodama koje su prikladne za određivanje ukupnog organskog ugljika. Stoga, da bi utvrdili da je svaka od tih analitičkih metoda prikladna za određenu svrhu i da će iz nje proizaći pouzdani i točni rezultati, potrebno je provesti postupak validacije te metode.

2. Pregled literature

2.1. Prirodna organska tvar

Prirodnu organsku tvar čine skupine organskih spojeva na bazi ugljika koje možemo pronaći u površinskim i podzemnim vodama. Oni su posljedica prirodnih procesa u okolišu poput raspadanja tvari biljnog i životinjskog porijekla te raznih bioloških aktivnosti kao što su metaboličke aktivnosti mikroorganizama, algi te izlučevina vodenih organizama (Benjamin 2002.).

Spojevi prirodne organske tvari sastoje se od aromatskih prstenova i molekula povezanih u alifatske lance na koje se vežu razne skupine poput karboksilnih, amidnih, hidroksilnih i dr. (Benjamin 2002.). Prema definiciji koju daju Leenheer i sur. (2003) prirodnu organsku tvar sačinjavaju aminokiseline, polisaharidi i proteini koji spadaju u nehuminsku skupinu tvari te fulvinska i huminska kiselina koje čine huminsku skupinu tvari. Obje skupine tvari otprilike čine jednu polovinu organskog ugljika u vodi. Iako su svi ti spojevi po nekim karakteristikama slični, razlika je vrlo uočljiva i to zbog njihove količine i stupnja reaktivnosti. Osim toga ti autori navode da reaktivnost i koncentracija prirodnih organskih tvari ovisi o raznim čimbenicima, a neki od njih su promjena godišnje temperature i padalina, karakteristike slivnog područja, mikrobiološka aktivnost, klimatske promjene te antropogeni utjecaj, tj. utjecaj ljudi i životinja (Leenheer i sur. 2003.). Prema istraživanjima, vrijednosti organskih parametara u vodi ljeti rastu, dok zimi i u proljeće opadaju, no to ne mora uvijek biti tako (Assmann i sur. 2017.).

Organska tvar u vodu može ući na dva načina, *izvana* (iz vanjskih izvora) i *iznutra*. Tvar koja u vodu ulazi izvana naziva se alohtona tvar i ona ulazi u vodu kao posljedica ispiranja tla, a tvari koje ulaze iznutra, tj. stvaraju se u vodi nazivamo autohtone tvari te one nastaju raspadanjem makrofita, algi i mikrobiološkom aktivnošću (Assmann i sur. 2017.). Voda u kojoj se nalazi više alohtonih organskih tvari sadrži aromatične i hidrofobne spojeve koji su manje topivi, imaju veću molekularnu masu i aromatičniji su te se opisuju kao huminske tvari, dok voda s alohtonim i autohtonim organskim tvarima sadrži hidrofilne tvari koje opisujemo kao nehuminske tvari (Clark i sur. 2001.).

2.2. Ukupni organski ugljik (TOC)

Ukupni organski ugljik ili eng. *total organic carbon* (TOC) predstavlja mjeru organskih tvari, koje su na bazi ugljika vezanog za otopljene ili suspendirane tvari, a nalaze se u vodenom sustavu. TOC se može definirati kao razlika između anorganskog i ukupnog ugljika u koji ubrajamo anorganski i organski ugljik te ugljik kao element (HRN EN 1484:2002). Prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013) ukupni organski ugljik spada u osnovne fizikalno-kemijske elemente kakvoće vode za ocjenu ekološkog stanja površinskih i podzemnih voda.

TOC je jedan od važnijih pokazatelja kakvoće voda jer se pomoću njega procjenjuje postupak učinkovitosti pročišćavanja otpadnih voda. Primjenjuje se u širokom rasponu u procesima upravljanja otpadnim vodama i postrojenjima koja se koriste za opskrbu pitke vode i monitoring površinske vode (Florescu D. et al. 2011.). Također, TOC se koristi za praćenje kvalitete i učinkovitosti opreme u mnogim postupcima pročišćavanja vode te se upotrebljava u mnogim industrijama i primjenama (Mettler toledo 1995.).

Također, TOC je jedan od glavnih pokazatelja kakvoće vode i koristi se kao indikator kontaminacije. Zbog toga, vrlo je važno voditi monitoring TOC-a iako on ne predstavlja izravnu opasnost za ljudsko zdravlje (Visco i sur. 2005.).

2.2.1. Koncentracije TOC-a u vodi

Prvo što se mora uzeti u obzir kod određivanja TOC-a je tip vode koji se određuje jer svaki tip vode karakteriziraju različiti parametri kao što su salinitet, temperatura, pH vode, okolna vegetacija i mikrobiološka aktivnost. Koncentraciju TOC-a u vodi možemo pronaći u rasponu od 1-10 mg/L, odnosno u podzemnim vodama nalazi se manje od 1 mg/L, u rijekama i jezerima od 2-10 mg/L, a u močvarama i barama uglavnom oko 10 mg/L (Visco i sur. 2005.).

Prema Bekiari i sur. (2013.) mjerenje koncentracije TOC-a u vodi vrši se u svim tipovima vode (podzemne, površinske, otpadne, bazenske vode i voda za ljudsku potrošnju) i ocjenjuje se prema propisanoj zakonskoj legislativi, tj. prema Pravilniku o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koji obavljaju djelatnost javne osobe, Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda te prema Uredbi o standardu kakvoće voda. Mjerenje se provodi radi kontrole samog procesa upravljanja vodama (pr. stupanj pročišćavanja otpadnih voda) i zadovoljavanja regulativa koje se primjenjuju zbog povećane koncentracije TOC-a u vodi (Bekiari i sur. 2013.).

U vodenim sustavima u kojim je koncentracija ugljika veća, dolazi do povećane potrošnje kisika zbog povećane mikrobiološke aktivnosti. Povećana aktivnost mikroorganizama ima utjecaj na kruženje hranjivih tvari, biokemijske procese, transport kemijskih tvari, interakcije i biološku dostupnost. Isto tako, može utjecati i na procese obrade vode za piće te obradu

otpadnih voda (Doležal i sur. 2003.). Povećana vrijednost TOC-a u vodi, samim time i koncentracije organskih spojeva, rezultira nastankom nusprodukata prilikom postupka obrade vode te rastom bakterija u sustavu za distribuciju vode čime se smanjuje čistoća i kvaliteta vode (Bekiari i sur. 2013.). Upravo zbog toga onečišćenja vode može doći do oštećenja sustava i uređaja za distribuciju vode koji za ispravan rad zahtijevaju vodu visokog stupnja čistoće (ASTM D5173-15 2015.). Pravovremenim kvantificiranjem povišene koncentracije organskih zagađivala, pa tako i ukupnog organskog ugljika, mogu se zaštititi kako potrošači, tako i proizvodni i industrijski sustavi te okoliš (Avramidis, i sur.. 2015.).

Stoga, važno je planirati i provoditi sustavni monitoring, tj. praćenje koncentracije TOC-a u vodoopskrbnom sustavu vode za piće, isto tako i u sustavima otpadne vode koje potječu iz raznih industrija i postrojenja.

2.3. Otopljeni organski ugljik (DOC)

Otopljeni organski ugljik (DOC) tehnički je definiran kao filtrat (0,45 µm) heterogene smjese organskih koloida i organskih otopina (Zovko i Romić 2011.). Koloidnu frakciju čini huminska komponenta koja predstavlja smjesu huminske i fulvo kiseline. Fulvo kiselina ima manju molekulsku masu i veću ukupnu kiselost u odnosu na huminsku kiselinu. Ona je topljivija i dominantnija u otpinima i vrlo je važan kompleks za katione metala te izravno utječe na biopristupačnost i transport metala. Otopine fulvokiseline u vodi su jako kisele, s kationima alkalnih metala i NH_4^+ ionima stvaraju soli fulvate, koji su lako topivi u vodi i podložni migraciji. Mobilnost organskih koloida u DOC-u ovisi o reakciji medija (pH), koncentraciji elektrolita i sastavu elektrolita (udio jednovalentnih u odnosu na dvovalentne ione). Za DOC je karakteristično povećanje stupnja topivosti i mobilnosti pri neutralnom i alkalnom pH. Stabilnost koloida se smanjuje s povećanjem koncentracije elektrolita (Inaba i Takenaka 2004.). Huminska kiselina je puno osjetljivija na promjene elektrolita u odnosu na fulvo kiselinu zbog svoje veće molekularne mase.

Koncentracije DOC-a u podzemnim vodama su obično manje od onih u površinskim vodama. Većina otopljenog organskog ugljika potječe od prirodnog organskog materijala nastalog degradacijom bioloških materijala. To su složene smjese heterogenih makromolekula koje je praktički nemoguće odvojiti u svoje sastavne materijale. U mnogim vodama, osobito u gorskim, većina DOC-a je prisutna u obliku visoko molekularnih težina; huminske i fulvinske kiseline, isto tako, mogu biti prisutni ugljikohidrati manje molekularne težine te aminokiseline (De Vivo i sur. 2006.).

Iako je količina DOC-a u prirodnoj vodi manja u usporedbi s anorganskim otopinama, organski materijali koji se prirodno pojavljuju su vrlo učinkovita sredstva za kompleksiranje metala, poput Al, Cu, Pb, Zn i Cd te njihovu topljivost i transport. Prirodni organski materijali također sudjeluju u redoks reakcijama i daju supstrate za rast mikrobionata (De Vivo i sur. 2006.).

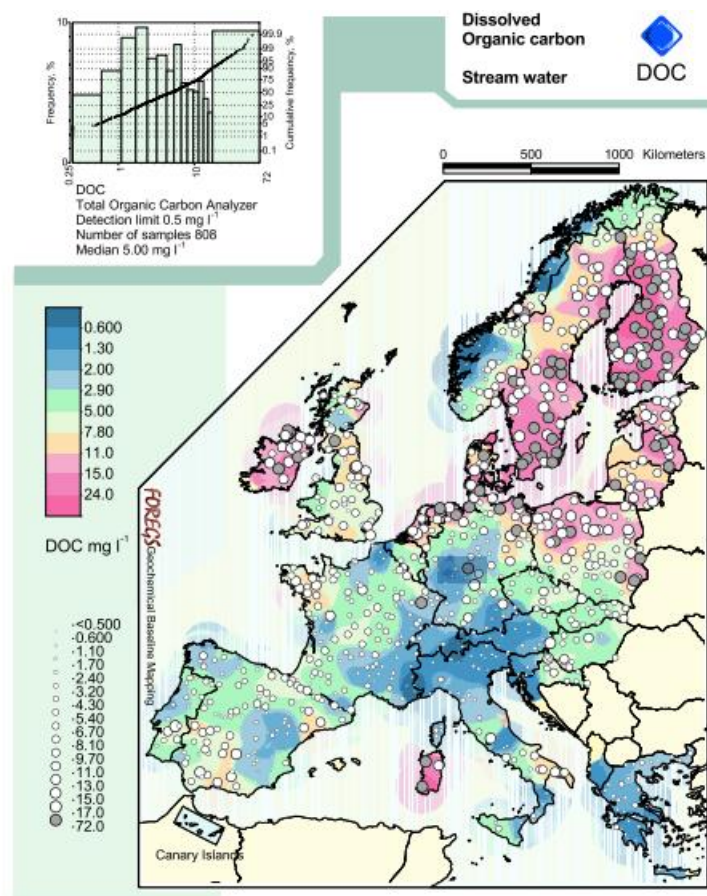
Visoke koncentracije DOC-a u podzemnim vodama najčešće se povezuju s izlivanjem procijednih voda iz odlagališta. Na primjer, kratki lanac anion-alifatske kiseline, kao što je

acetat, proprionat i butirata, može se pojaviti u vodi koja je kontaminirana naftom. Halogenirane organske tvari, npr. poliklorirani bifenili (PCB) i pesticidi, poput diklor-difenil-trikloretna (DDT), su među stabilnijim vrstama u vodi. Također, kemijske industrije u razvijenim zemljama proizvode velike količine sintetske organske tvari ugljičnog materijala, otpad i nusproizvode koji nisu prirodnog porijekla. Ovi proizvodi su široko raspršeni u hidrosferi tijekom proizvodnje, uporabe i zbrinjavanja otpada te na taj način onečišćuju okoliš i predstavljaju potencijalnu opasnost za zdravlje živih bića (Salminen, R. 2005.F).

2.3.1. Koncentracije DOC-a u vodi

Razlike u koncentracijama DOC-a u vodotocima Europe su jako izražene (*Slika 2.3.1.1.*). Tako najniže vrijednosti DOC-a u vodi (<2 mg/L) nalaze se u cijeloj južnoj Europi i Mediteranu, na područjima gdje je više sušna, ali i planinska klima (npr. Alpe). Norveška također ima niske razine DOC-a u usporedbi s ostatkom skandinavskih zemalja, osobito duž njezine zapadne obale. Niska vrijednost DOC-a može biti zbog obilne kiše i učinka razrjeđivanja i brzog protoka vode u planinskom području (Salminen, R. 2005.).

Najviše vrijednosti DOC-a u vodi (> 14.5 mg/L) nalaze se u sjevernoj Europi, osobito u cijeloj Irskoj, na jugu Švedske i Finske, ali ne i u Norveškoj i Engleskoj. Visoke razine DOC-a u tim područjima posljedica su uglavnom različitih procesa razgradnje huminskih tvari koji se karakteristično akumuliraju ravničarskim, močvarnim područjima kao posljedica anoksičnih uvjeta (redukcijskog okoliša) osobito u Finskoj, sjevernoj Poljskoj, sjevernoj obali Njemačke, Danske i Irske.



Slika 2.3.1.1. Prikaz koncentracije DOC-a u vodotocima na području Europe

Izvor: Salminen, R. 2005.

2.4. Validacija

Validacija metode, procjena mjerne nesigurnosti i kontrola kvalitete rezultata neophodni u radu analitičkog laboratorija za dokazivanje osposobljenosti (Krivohlavek i sur. 2005.). Validacija je postupak dokazivanja prikladnosti metode za točno određenu namjenu HRN EN ISO/IEC 17025 (2007.). U širem smislu to je postupak u kojem se koristi grupa testova pomoću kojih se ispituju analitičke metode koje se temelje na pretpostavkama i kojima se dokumentiraju i utvrđuju karakteristike provedene metode, što dokazuje je li analitička metoda prihvatljiva za određenu svrhu (IUPAC Technical Report 2002.).

U praksi validacija metode se provodi procjenom izvedbenih značajki kemijskog mjernog procesa, a to su: točnost i preciznost, selektivnost i specifičnost, osjetljivost metode, granice kvantifikacije i dokazivanja, otpornost metode, iskoristivost i linearnost (Kaštelan-Macan i Petrović 2013.). Validacija je jedna od mjera unutrašnje kontrole kvalitete ispitivanja, a kako navodi Marinčić i sur. (2005.) jedna od glavnih prednosti provođenja validacijskih pokusa je upravo procjena kritičnih točaka u procesu ispitivanja, ocjena iskustva analitičara koji provode ispitivanje, ali i drugih čimbenika koji se otkriju da su važni. U tom smislu Marinčić

i sur. (2005.) naglašavaju važnost provjere iskorištenja i preciznosti tijekom validacijskog protokola na konkretnom uzorku ili seriji uzoraka itd.

Prema Gašljević V. (2010.) sve analitičke metode međusobno se razlikuju. Iz tog razloga, validaciji različitih metoda ne može se pristupiti jednako. Stoga, tijekom svakog procesa validacije vrlo važno slijediti određene korake, odnosno prepoznati bitne radne značajke metode, tj. parametre validacije i potrebno je postaviti određene zahtjeve (kriterije) na te značajke.

Prije same validacije potrebno je utvrditi analitički zahtjev i sustav. Analitički sustav sadrži vrstu metode i njen cilj, raspon koncentracija, vrstu analita te maticu uzorka na koju se mjerni postupak i metoda primjenjuju. Jasna specifikacija analitičkih zahtjeva je temelj dobre analize, a ona određuje najmanje kriterije prihvatljivosti za različite kriterije ili određenu namjenu koje metoda treba zadovoljiti da bi se određeni problem riješio (Kaštelan-Macan i Petrović 2013.). Osim toga, proces validacije analitičarima daje određenu sigurnost i pruža vjerodostojnost dobivenih rezultata (Lopez Garcia, i sur. 2011.).

2.4.1. Parametri validacije

Najznačajnije značajke koje se izvode, a određuju se i prilikom procjene mjerne nesigurnosti su preciznost i točnost.

Preciznost predstavlja ponovljivost rezultata koji se dobivaju pomoću iste metode, istih uzoraka i u istim uvjetima te obnovljivost kada su metoda i uzorci isti, ali uvjeti su promijenjeni, npr. analitičar, vrijeme ili mjesto. Također, preciznost govori i o veličini slučajne pogreške (Kaštelan-Macan i Petrović 2013.).

Točnost možemo opisati kao razliku između prave i prosječne vrijednosti u nizu mjerenja, odnosno kao referentnu vrijednost koja je uglavnom uzrokovana sustavnom pogreškom. Točnost možemo procijeniti uporabom referentnog materijala. Ako dođe do manjka odgovarajućeg referentnog materijala, kao zamjenu možemo iskoristiti poznatu količinu analita i dodati ju matici uzorka. U tom slučaju određuje se iskoristivost metode koja prikazuje podatak o točnosti određivanja izmjerene količine analita, u postotnom obliku, u odnosu na količinu analita dodanog u uzorak. Iz toga možemo vidjeti da što je iskoristivost manja, sustavna pogreška metode je veća, a samim time točnost određivanja je isto tako manja. Također, točnost se može prikazati i usporedbom rezultata koji su dobiveni pomoću neke nezavisne standardne metode. Točnost možemo dokumentirati pomoću kontrolnih dijagrama kao razliku između izmjerene i prave vrijednosti referentnog materijala koji mora biti analiziran i certificiran. Točnost i iskoristivost ovise o koncentraciji analita, pa se moraju procijeniti za najmanje tri različite koncentracije u okviru radnog područja metode (Kaštelan-Macan i Petrović 2013.).

Specifičnost prikazujemo kao mogućnost nedvosmislenog određivanja analita u složenoj matici uzorka, a selektivnost je svojstvo metode da njome kvantificiramo i identificiramo analit koji tražimo uz prethodno uklanjanje interferencija (Kaštelan-Macan i Petrović 2013.).

Granicu kvantifikacije opisujemo kao najmanju moguću koncentraciju analita koju možemo odrediti uz grešku koja je dopuštena, dok je granica dokazivanja najmanja moguća koncentracija analita koju možemo dokazati, ali ne i odrediti kvantitativno. Granicu kvantifikacije i granicu dokazivanja izračunavamo na različite načine. Granica dokazivanja izražava se kao koncentracija najmanjeg signala kojeg možemo detektirati uz razumnu vjerojatnost za određeni analitički postupak. Najmanji signal jednak je

$$(1) \quad k * s_{s,v}$$

gdje je $s_{s,v}$ standardno odstupanje niza mjerenja slijepe vrijednosti, a k predstavlja koeficijent koji se izabire ovisno o željenom stupnju vjerojatnosti. Što je k veći, stupanj vjerojatnosti je isto tako veći. IUPAC i Eurachem preporučuju $k=3$, pri čemu postoji samo 1%-tna vjerojatnost da signal veći od $3*s_{s,v}$ potječe od slijepog uzorka. Za određivanje granice kvantifikacije preporučuje se $k=10$ (Kaštelan-Macan i Petrović 2013.).

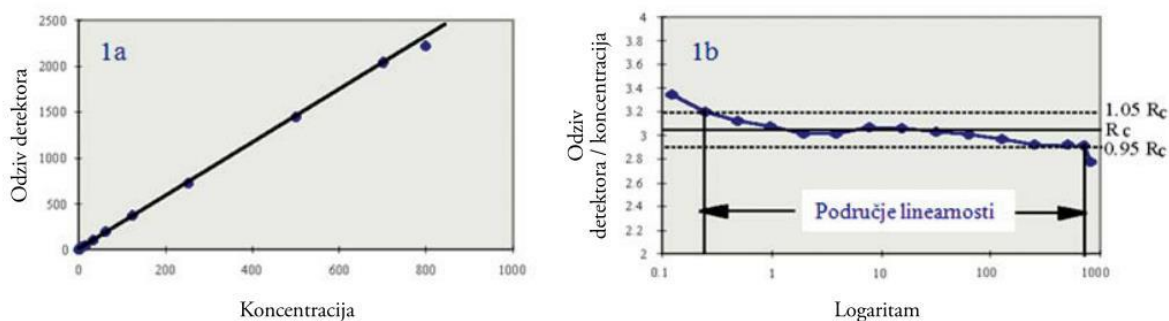
Mogućnost da se metodom unutar radnog područja dobije ovisnost mjernih rezultata o koncentraciji analita koja je izravno proporcionalna predstavlja linearnost. Linearnost se određuje mjerenjem odziva signala provedene metode kod različitih i poznatih koncentracija referentnog materijala gdje se preporučuje analizirati najmanje pet koncentracija uz tri uzastopna ponavljanja na temelju kojih se u konačnici uzima aritmetička sredina rezultata. Područje koje je linearno može se razlikovati u odnosu na različite matice uzorka zbog prisutnih interferencija. Utjecaj interferencija procjenjuje se pripravom umjerenih standarda koji su sastavom što sličniji uzorku odnosno metodom dodatka standarda, kada se u maticu uzorka dodaju različite količine, tj. koncentracije analita. Utjecaj matrice procjenjuje se usporedbom nagiba krivulje kada je umjeravanje provedeno čistim standardnim otopinama i nagiba dobivene umjerne krivulje (Kaštelan-Macan i Petrović 2013.).

Procjenu linearnosti provodi se grafički i matematički. Grafički prikazi odziva detektora o koncentraciji odnosno ovisnosti signala vrlo su važni zbog mogućnosti vizualnog nadzora. Postoje razni načini korištenja grafičkog prikaza, no dva najčešća (*slika 2.4.1.1.*) koja se upotrebljavaju su:

- Grafička ovisnosti odziva detektora o koncentraciji standardnih otopina
- Grafički prikaz relativnih signala koji prikazuje omjer odziva detektora i odgovarajuće koncentracije na osi y i odgovarajućih koncentracija na osi-x prikazanih na log skali. Linija koja se u konačnici dobije mora biti vodoravna na cijelom linearnom području, a područje linearnosti završava kod koncentracija gdje linija relativnog odziva presijeca paralelne linije koje odgovaraju 105 %-tnoj ili 95 %-tnoj koncentraciji (Kaštelan-Macan i Petrović 2013.).

Matematički prikazi određuju se primjenom linearne regresijske analize gdje se ovisnost koncentracije o odzivu instrumenta izražava jednadžbom pravca $y=ax+b$ i izračunava se koeficijent determinacije (r^2). (a) odnosno nagib pravca prikazuje osjetljivost metode, dok (b) ili odsječak pravca prikazuje odziv instrumenta slijepog uzorka. Do sustavne pogreške može

doći ako oduzimanjem odaziva instrumenta slijepog uzorka i dalje na ordinati ostaje odsječak (Kaštelan-Macan i Petrović 2013.).



Slika 1.4.1.1. Dva načina grafičkog prikaza linearnosti

Izvor: Lazarić K, Gašljević V: Validacija analitičkih metoda. Hrvatsko mjeriteljsko društvo, Zagreb, 2012..

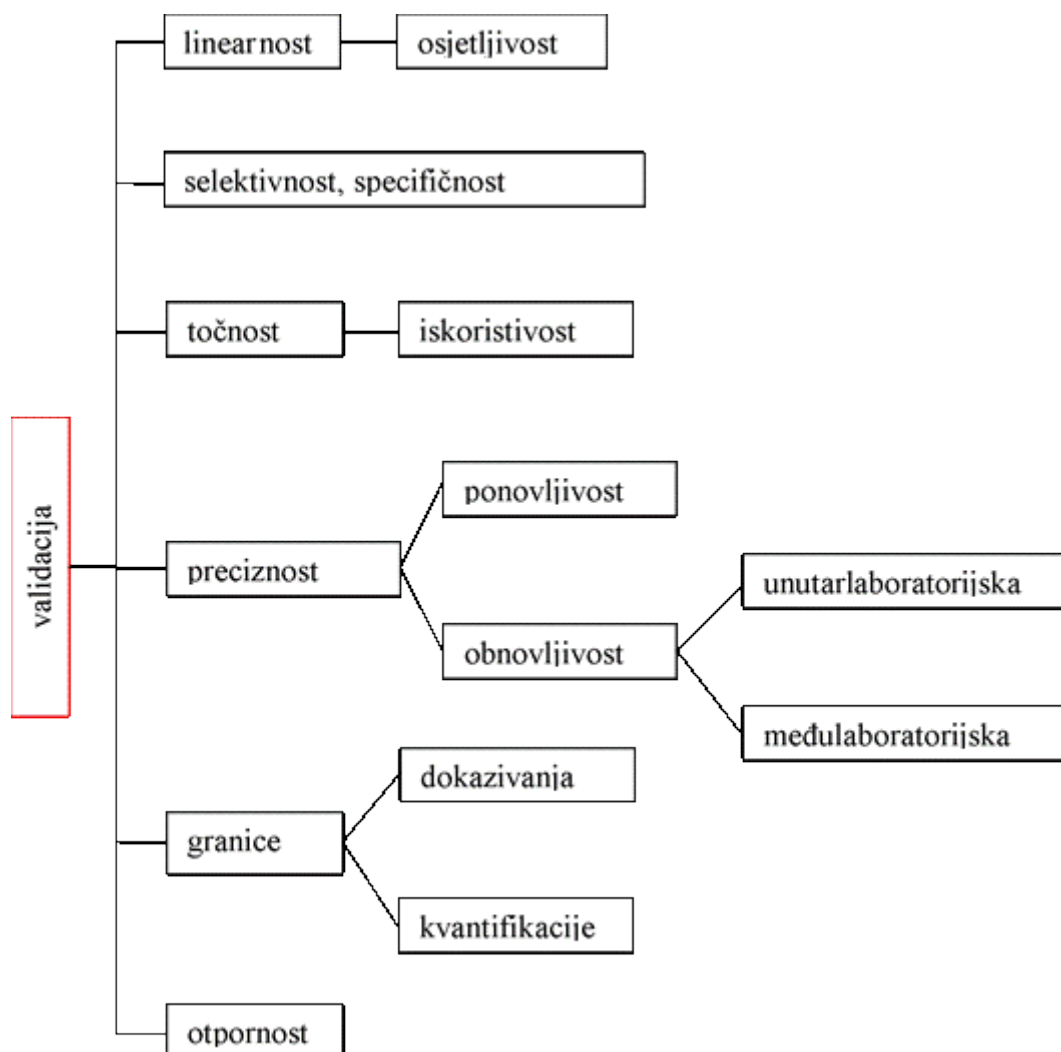
Pomoću nagiba umjernog pravca, možemo odrediti i osjetljivost koju definiramo kao svojstvo metode ili instrumenta da razlikuje uzorke različitih koncentracija analita uz razinu pouzdanosti koja je definirana te da procjenjuje granice dokazivanja (Kaštelan-Macan i Petrović 2013.).

Analitičku metodu možemo provoditi u laboratoriju za ispitivanje samo ako je otporna, odnosno kada uobičajene promjene u radu u laboratoriju sigurno neće imati utjecaj na pouzdanost podataka. Te promjene mogu biti male promjene u temperaturi kod postupka priprave uzoraka, zamjena nekih dijelova uređaja ili instrumenta, starenje kromatografske kolone, male promjene u matici uzorka ili okolišne promjene poput vlažnosti, temperature, atmosferskog zraka i dr. Uvjeti koji su kritični za provedbu analize moraju se procijeniti i nadzirati, tj. moraju se provesti faktorske analize kako bi se ispitaio utjecaj. Određivanjem otpornosti metode određuju se i znatniji utjecaji čimbenika na analitički rezultat (Kaštelan-Macan i Petrović 2013.).

Validacija je potpuna ako se određuju sve značajke metode, a može biti i djelomična ako se određuju samo neke. Validacijski stupanj ovisi o analitičkim zahtjevima i analitičkoj metodi, ovisno o namjeni metode ili problemu koji se rješava. Validaciju ne treba ponavljati kada se koriste normirane prethodno validirane metode, nego se samo potvrđuje primjenjivost analitičke metode u laboratoriju (Kaštelan-Macan i Petrović 2013.).

Svaka nova metoda se mora validirati. S obzirom na to da se validacija uvijek odnosi na određeni analitički sustav, ponavljanje validacije je potrebno svaki puta kada se promjeni dio analitičkog sustava ili ako se utvrdi da metoda koja se koristi više nije prikladna. Kod validacije nove metode obavezno je određivanje točnosti, ponovljivosti, obnovljivosti, selektivnosti i otpornosti, a granica detekcije i kvantifikacije i linearnost određuju se prema potrebi. Da bi metoda bila modificirana potrebno je odrediti samo točnost i preciznost, a

ponekad i granicu kvantifikacije. Kod određivanja glavnih sastojaka, bilo bi dobro ispitati radno područje i linearnost, a kod analize tragova i ultratragova najvažnije je odrediti granice kvantifikacije i dokazivanja (Kaštelan-Macan i Petrović 2013.).



Grafički prikaz 2.4.1.1. Izvedbene značajke metode koje se procjenjuju postupkom validacije

Izvor: Kaštelan-Macan M, Petrović M. (2013.). Analitika okoliša. HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Denona.

Svaka vrsta uzoraka zahtjeva različito planiranje validacijskih postupaka. Što je uzorak (matriks uzorka) nestabilniji potrebno je pažljivije pristupiti provođenju postupaka validacije. U tom smislu, validacijski postupci koji se provode na uzorcima voda (površinske, podzemne, procjedne, drenažne, otpadne vode) naročito su zahtjevni. Sustavi upravljanja kvalitetom u laboratoriju uglavnom zahtijevaju i da se validacijski postupci vežu specifično za vrstu voda. Kako bi postupci validacije bili točni, a rezultati precizni, validacija se provodi od samog uzimanja uzoraka, konzerviranja, transporta, preuzimanja do korištenja istih u laboratoriju. Ti postupci ne smiju ni u bilo kojem slučaju utjecati na rezultat ispitivanja u laboratoriju.

Na primjer, Zgorelec i sur. (2007.) radili su istraživanja na utjecaju gnojidbe i biljnog pokrova na gubitak dušika s vodom iz tla gdje su za određivanje amonij iona u drenažnim cijevima koristili metodu ionske kromatografije za koju je bilo potrebno provesti validaciju kako bi se dokazalo da je ta metoda prihvatljiva za tu svrhu. Prije svega morali su pažljivo postupati prilikom uzorkovanja, konzerviranja, prijenosa i korištenja uzoraka u provođenju analiza i postupcima validacije kako ne bi došlo do kontaminacije uzoraka i kako bi rezultat bio precizan. S obzirom na pravilno postupanje s uzorcima rezultat validacije je bio precizan i točan i pokazao je da su odstupanja zanemariva te da se ta metoda može koristiti za tu svrhu.

3. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je provesti sekundarnu validaciju (verifikaciju) postupka ispitivanja ukupnog organskog ugljika u vodama metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije.

Zbog prethodno navedenog, potrebna je profesionalna odgovornost analitičara (laboratorija) za izdavanje točnih, pouzdanih i usporedivih mjernih rezultata gdje je jedan od preuvjeta dokazati kako odabrani mjerni postupak može ispuniti zahtjeve za posebnu predviđenu uporabu.

4. Materijali i metode

Ovo istraživanje temelji se na određivanju ukupnog organskog ugljika u vodi pomoću metode visokotemperaturne katalitičke oksidacije. Cilj istraživanja je provesti validaciju te metode odnosno provesti validacijske postupke; preciznost ispitivanja (ponovljivost i obnovljivost), linearnost, istinitost te granicu detekcije i kvantifikacije. U analiziranju se koriste prirodni uzorci površinske vode iz potoka Bliznec i Divlje vode te referentni uzorci stabiliziranih voda iz međulaboratorijskih usporedbi.

Uzorkovanje se provelo na navedenim lokacijama u dva navrata, pet uzoraka vode po svakoj od lokacija, te su iz svakog uzorka priređena dva poduzorka. Prihvatljivost metode je ocijenjena uzimajući u obzir propisane radne značajke metode i kriterije prihvatljivosti sukladno smjernicama za određivanje ukupnog organskog ugljika (HRN EN 1484:2002). Svi validacijski pokusi su provedeni u ponavljanjima, prema protokolima postavljenim sukladno normi HRN EN ISO 17025:2006.

4.1. Priprema uzoraka za DOC

Kako bi pripremili uzorci za određivanje otopljenog organskog ugljika oni se moraju najprije iskoristiti unutar 24 sata od uzorkovanja. Svakom uzorku dodjeljuje se analitički broj i oznaka uzorka kako bi se znalo koji je uzorak s koje lokacije.

Priprema uzoraka za DOC i TOC su vrlo slične, no razlika je u tome što se uzorci za određivanje DOC-a moraju profiltrirati kroz membranski filter veličine pora 0,45 μm (*slika 4.1.1.*, *slika 4.1.2.*). Nakon svakog uzorka filter se baca, a kiveta kojom se uzorak ubrizgavao u filter se mora isprati.



Slika 4.1.1. Uzimanje uzoraka za filtriranje

Izvor: vlastiti



Slika 4.1.2. *Ubrizgavanje uzoraka vode u membranski filter veličine pora 0,45 μm*

Izvor: vlastiti

Nakon filtriranja, uzorke je potrebno zakiseliti kako bi pH uzorka bio manji od 2, a samim time uzorak se i stabilizira. Uzorci se mogu zakiseljavati i automatski na instrumentu, no kako ne bi došlo do neke pogreške u zakiseljavanju, bolje je zakiseliti ručno. Za zakiseljavanje uzorka koristi se 37%-tna HCl (*slika 4.1.3.*), u uzorak se dodaje cca. dvije kapi kiseline. Potrebno je zakiseljavati i razrijeđene i nerazrijeđene uzorke. Istraživanje se temelji na određivanju koncentracije organskog ugljika, a zakiseljavanjem uzoraka uklanja se anorganski ugljik.



Slika 4.1.3. *37%-tna HCl za zakiseljavanje uzoraka vode*

Izvor: vlastiti

Zatim, nakon zakiseljavanja, uzorci se stavljaju u ploču za uzorke na instrumentu koji određuje koncentraciju otopljenog organskog ugljika proizvođača Elementar (*Slika 4.1.4.*), koji radi na principu mjerenja vezanog ugljika u CO₂ oksidacijom. Tekući uzorak se izravno ubrizgava u komoru za izgaranje na 850 °C koristeći nulti zrak za struju nosivog plina. Plin se suši i protok se stabilizira i mjeri pomoću nedisperzivnog infracrvenog detektora (NDIR).

Povezano računalo izračunava ukupnu koncentraciju ugljika (TC) iz izmjerenog CO₂ signala i volumena ubrizganog uzorka. Anorganski ugljik (TIC) može se automatski mjeriti zakiseljavanjem uzorka u raspršivaču, skidanjem i detektiranjem oslobođenog CO₂. Sadržaj ukupnog organskog ugljika (TOC) izračunava se iz razlike TC i TIC ($TOC = TC - TIC$).



Slika 4.1.4. Uređaj proizvođača Elementar za određivanje TOC-a i DOC-a

Izvor: vlastiti

4.2. Opis validacijskog pokusa

U postupku validacije gdje je bio cilj dokazati da uspostavljena metoda (NPOC) određivanja ukupnog organskog ugljika u vodama služi svojoj svrsi, izvedene su sljedeće značajke: preciznost (ponovljivost i obnovljivost), istinitost, linearnost, granica detekcije i kvantifikacije.

4.2.1. Preciznost

Preciznost je određena pod uvjetima ponovljivosti i obnovljivosti. Pokus ponovljivosti mjerenja proveden je na homogenim autentičnim uzorcima, pripremljenim standardnim otopinama točno određene koncentracije kalijevog hidrogenftalata (1 mg/l; 3 mg/l; 5 mg/l). Postupak mjerenja svakog navedenog uzorka ponovljen je 10 puta kako bi se zadovoljili minimalni zahtjevi statistike. Pokus ponovljivosti niza od 10 mjerenja svakog pojedinog standarda proveden je u uvjetima koji su bili što sličniji pri rutinskoj uporabi metode.

- Standard od 1 mg/l pripremljen je: 1 mg kalijevog hidrogenftalata
- Standard od 3 mg/l pripremljen je: 3 mg kalijevog hidrogenftalata
- Standard od 5 mg/l pripremljen je: 5 mg kalijevog hidrogenftalata

Iz rezultata provedenih mjerenja kvantificirana je slučajna pogreška metode, standardna devijacija, koeficijent varijacije i iskorištenje (%).

4.2.1.1. Ponovljivost pripreme standarda

Ponovljivost pripreme standarda ispitana je mjerenjem TOC-a odnosno organskog ugljika iz 6 različitih otopina standarda kalijevog hidrogenftalata koncentracije 3 mg/l. Iz rezultata provedenih mjerenja kvantificirana je standardna devijacija i relativno standardno odstupanje.

4.2.2. Istinitost

Pokus za značajku validacije istinitosti proveden je nakon pokusa za preciznost metode. Istinitost mjerenja definirana je kao stupanj podudaranja prihvaćene referentne vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene provedbom mjerenja za ocjenu preciznosti metode. Samim time istinitost metode predstavlja razliku između aritmetičke sredine rezultata i navedene referentne vrijednosti. Pokus je proveden 3 puta za 3 koncentracijske razine raspoređene unutar radnog područja metode (1 mg/l; 3 mg/l; 5 mg/l). Kao pokazatelj istinitosti korištena je relativna standardna devijacija i srednje iskorištenje (%).

4.2.3. Linearnost

Linearnost je prema Lazarić (2012.) definirana kao mogućnost metode da unutar određenog područja daje ispitne rezultate proporcijalne koncentracije analita u uzorku. U ovom postupku validacije linearnost je određena mjerenjem odziva metode na referencijski materijal u 6 koncentracijskih razina. Linearnost je procijenjena matematički preko linearne regresije jednadžbe pravca: $y=ax+b$. Izračunat je koeficijent korelacije (k) i postavljen kriterij prihvatljivosti gdje k mora biti $>$ ili $=$ od 0,99.

4.2.4. Granica detekcije i kvantifikacije

Granica detekcije i granica kvantifikacije određene su statistički na bazi standardne devijacije, signala i nagiba jednadžbe pravca.

4.2.5. Kriteriji prihvatljivosti za određivanje ukupnog organskog ugljika u vodi

Za ocjenu prihvatljivosti metode Validacija metode visokotemperaturne katalitičke oksidacije kojom se određuje ukupni organski ugljik u vodi postavljeni su kriteriji prihvatljivosti koji su navedeni u *tablici 4.2.5.1.*

Tablica 4.2.5.1. Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti

Parametar		Kriterij prihvatljivosti	
Preciznost	Ponovljivost	Relativno standardno odstupanja (%)	< 10 %
	Obnovljivost	Relativno standardno odstupanja (%)	< 10 %
Istinitost		Iskorištenje	100±10%
Linearnost		k	>0.98
Granica detekcije		Informacija	3*STDEV
Granica kvantifikacije		Informacija	10*STDEV

Izvor: Analitički laboratorij (Zavod za melioracije, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet)

5. Rezultati i rasprava

5.1. Preciznost (ponovljivost i obnovljivost)

5.1.1. Ponorljivost mjerenja

U provedenom validacijskom pokusu ponovljivosti mjerenja ukupnog organskog ugljika (*tablica 5.1.1*) za svaki mjereni standard bez obzira na koncentraciju (1 mg/l, 3 mg/l i 5 mg/l), relativno standardno odstupanje (RSD) je bilo manje od 5% (0.8-2.4%). Najviše relativno standardno odstupanje utvrđeno je pri višestrukim mjerenjima najnižeg standarda (2,4 %). Pri očitavanju mjernih standarda u višem koncentracijskom području niža su relativna standardna odstupanja. Standardna devijacija provedenih uzastopnih deset mjerenja sva tri mjerna standarda bila je manja od 0.1.

Tablica 5.1.1.1. Rezultati provedenog validacijskog pokusa za ponovljivost mjerenja ukupnog organskog ugljika metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije

Mjerenje (N)	Standardna otopina		
	1 mg/l TOC	3 mg/l TOC	5 mg/l TOC
1	1.057	3.000	5.068
2	1.095	3.018	5.011
3	1.041	3.089	5.065
4	1.064	3.075	5.068
5	1.037	3.064	5.119
6	1.039	3.056	5.050
7	1.103	3.100	5.040
8	1.057	3.025	4.998
9	1.096	3.014	5.104
10	1.082	3.028	5.095
Srednja vrijednost	1.07	3.05	5.06
Standardna devijacija	0.025	0.034	0.039
RSD (%)	2.4	1.1	0.8

Izvor: Analitički laboratorij (Zavod za melioracije, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet)

5.1.2. Ponorljivost pripreme standarda

Ponorljivost pripreme standarda ispitana je mjerenjem organskog ugljika u 6 različitim otopina (različite odmjerne tikvice) standarda kalijevog hidrogenftalata koncentracije 3 mg/l. Rezultati ponovljivosti pripreme standarda prikazani su u *tablici 5.1.2.1*. Za pripremljene standardne otopine kalijevog hidrogenftalata koncentracije 3 mg/l odstupanje od nominalne koncentracije standarda kretalo se u rasponu od 1.6 do 6.3 %, te je srednja vrijednost odstupanja od teoretske koncentracije bila 4,6 % i standardna devijacija 1.8.

Tablica 5.1.2.1. Podaci o ponovljivosti 6 različitih otopina (različite odmjerne tikvice) standarda kalijeveg hidrogenftalata koncentracije 3 mg/l organskog ugljika.

Mjerenje (N)	TOC mg/l	Odstupanje od teoretske koncentracije 3 mg/L (%)
1	3.016	1.6
2	3.059	5.9
3	3.046	4.6
4	3.035	3.5
5	3.063	6.3
6	3.059	5.9
Srednja vrijednost	3.046	4.6
Standardna devijacija	0.018	1.8

Izvor: Analitički laboratorij (Zavod za melioracije, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet)

5.1.3. Obnovljivost mjerenja

Obnovljivost mjerenja je utvrđivanje stupnja rasipanja rezultata mjerenja dobivenih od strane većeg broja mjeritelja pri višestrukome mjerenju. Obnovljivost se najčešće ocjenjuje na temelju rezultata sudjelovanja laboratorija u ispitivanjima sposobnosti. Analitički laboratorij (Zavod za melioracije, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet) sudjeluje u ispitivanjima sposobnosti za ionski sastav prirodnih voda. Za potrebe određivanja obnovljivosti mjerenja korišteni su rezultati sudjelovanja analitičkog laboratorija u ispitivanju sposobnosti za područje vode za analizu makrohranjiva, u suradnji s laboratorijem University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Department for Agrobiotechnology, IFA-Tullin, Center for Analytical Chemistry iz Beča. Uzorak (oznaka N145B) je poslan od strane Organizatora ispitivanja sposobnosti IFA-Tullin dana 07. veljače 2019., a zaprimljen u ispitni laboratorij 09. veljače 2019. Uz uzorak koji je dostavljen u obliku spremnom za ispitivanje organskog ugljika dostavljena je i dodatna kiveta za očitavanje temperature uzorka vode. Uzorak je ispitan sukladno postupku koji se u laboratoriju primjenjuje za ispitivanje organskog ugljika u vodama.

U prethodno opisanoj rundi ispitivanja sposobnosti za određivanje ukupnog organskog ugljika u vodama sudjelovala su ukupno 41 laboratorija (*tablica 5.1.3.1.*). Ukupno relativno standardno odstupanje svih poslanih rezultata ispitivanja bilo je 8,6 %, a standardna devijacija bila je 0,2.

Tablica 5.1.3.1. Rezultati za obnovljivost mjerenja ukupnog organskog ugljika metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije

Oznaka uzorka	Parametar	Jedinica	Broj rezultata	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	RSD %	REZULTAT laboratorija
N145B	TOC	mg/l	41	2.18	0.187	8.6	1.87

Izvor: Analitički laboratorij (Zavod za melioracije, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet)

5.2. Istinitost

U ovom radu istinitost mjerenja određena je statističkom obradom podataka dobivenih iz pokusa za ponovljivost mjerenja ukupnog organskog ugljika metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije. Rezultati istinitosti mjerenja za pojedini radni standard dani su u *tablicama* 5.2.1. (radni standard 1 mg/l otopine kalijevog hidrogenftalata); 5.2.2. (radni standard 3 mg/l otopine kalijevog hidrogenftalata); 5.2.3. (radni standard 5 mg/l otopine kalijevog hidrogenftalata); Izračuna srednje vrijednosti, standardne devijacije i relativnog standardnog odstupanja od teoretskih koncentracija (iskorištenje, %) za ukupno deset mjerenja svakog standard (1 mg/l, 3 mg/l i 5 mg/l otopine kalijevog hidrogenftalata) prikazani su u *tablici* 5.2.4. Za svako pojedino injektiranje iste standardne otopine kalijevog hidrogenftalata koncentracije 1 mg/l iskorištenje se kreće od 103.7 – 110.3 %, uz srednju vrijednost iskorištenja od 107%. Srednja vrijednost iskorištenja za standardne otopine kalijevog hidrogenftalata koncentracije 3 i 5 mg/l bile su 102 odnosno 101 %, a relativno standardno odstupanje iskorištenja bilo je < od 2 %.

Tablica 5.2.1. Rezultati istinitosti mjerenja za standard kalijevog hidrogenftalata koncentracije 1 mg/l metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije

Br. mjerenja	TOC mg/l	Iskorištenje za 1 mg/L (%)
1	1.057	105.7
2	1.095	109.5
3	1.041	104.1
4	1.064	106.4
5	1.037	103.7
6	1.039	103.9
7	1.103	110.3
8	1.057	105.7
9	1.096	109.6
10	1.082	108.2
Srednja vrijednost	1.07	107
Standardna devijacija	0.025	2.520
Relativno standardno odstupanje (%)	2.4	2.4

Izvor: Analitički laboratorij (Zavod za melioracije, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet)

Tablica 5.2.2. Rezultati istinitosti mjerenja za standard kalijevog hidrogenftalata koncentracije 3 mg/l metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije

Br. mjerenja	TOC mg/l	Iskorištenje za 3 mg/L (%)
1	3.000	100.0
2	3.018	100.6
3	3.089	103.0
4	3.075	102.5
5	3.064	102.1
6	3.056	101.9
7	3.100	103.3
8	3.025	100.8
9	3.014	100.5
10	3.028	100.9
Srednja vrijednost	3.05	102
Standardna devijacija	0.034	1.150
Relativno standardno odstupanje (%)	1.1	1.1

Izvor: Analitički laboratorij (Zavod za melioracije, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet)

Tablica 5.2.3. Rezultati istinitosti mjerenja za standard kalijevog hidrogenftalata koncentracije 5 mg/l metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije

Br. mjerenja	TOC mg/l	Iskorištenje za 5 mg/L (%)
1	5.068	101.4
2	5.011	100.2
3	5.065	101.3
4	5.068	101.4
5	5.119	102.4
6	5.050	101.0
7	5.040	100.8
8	4.998	100.0
9	5.104	102.1
10	5.095	101.9
Srednja vrijednost	5.06	101
Standardna devijacija	0.039	0.775
Relativno standardno odstupanje (%)	0.8	0.8

Izvor: Analitički laboratorij (Zavod za melioracije, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet)

Tablica 5.2.4. Zbirni rezultati istinitosti mjerenja ukupnog organskog ugljika metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije

Standardna otopina	Broj mjerenja	Srednja vrijednost mjerenja (mg/l)	Iskorištenje (%)		
			Srednja vrijednost	Standardna devijacija	RSD (%)
1 mg/l TOC	10	1.07	106.7	2.5	2.4
3 mg/l TOC	10	3.05	101.6	1.1	1.1
5 mg/l TOC	10	5.06	101.2	0.77	0.77

Izvor: Analitički laboratorij (Zavod za melioracije, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet)

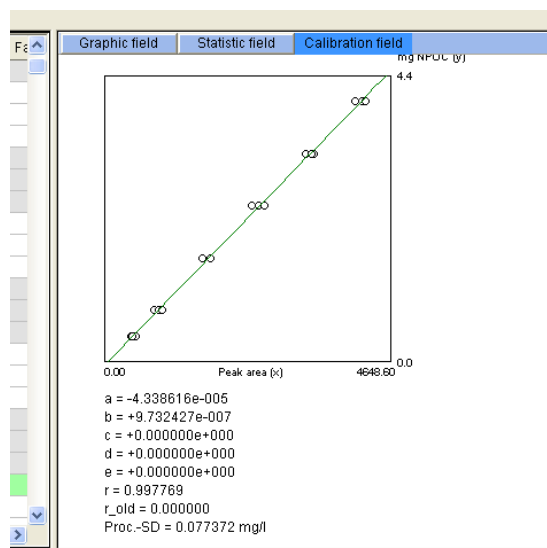
5.3. Linearnost

Linearnost je provjerena mjerenjem 5 otopina koncentracija 0, 0.5, 1, 1.5 i 2 mg/l organskog ugljika standarda kalijeveg hidrogenftalata. Podaci o površini pikova dani su u *tablici 5.3.1.* Konstruiran je kalibracijski pravac koji na osi *x* ima koncentracije standarda u mg/l, a na osi *y* odgovarajuće površine pikova (*slika 5.3.1.*).

Tablica 5.3.1. Podaci o površini pikova

Datum	Koncentracija kalijeveg hidrogenftalata mg/l	Površina pika
4. 11. 2019.	0.5	565
		655
		588
	1	944
		1023
		1071
	2	1726
		1862
		1859
	3	2530
		2631
		2721
	4	3405
		3537
		3485
	5	4195
		4319
		4362

Izvor: Analitički laboratorij (Zavod za melioracije, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet)



Grafički prikaz 5.3.1 Zavisnost površine pika 6 standardnih otopina kalijevog hidrogenftalata o koncentraciji pripremljenih otopina

Izvor: Analitički laboratorij (Zavod za melioracije, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet)

5.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Prema definiciji granica detekcije predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne i kvantificirati, a granica kvantifikacije najmanju količinu analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost (Lazarić, 2001.). Za potrebe određivanja granice detekcije i kvantifikacije provedeno je 15 (N) uzastopnih mjerenja ukupnog organskog ugljika u slijepoj otopini (sadrži sve kemikalije u istoj koncentraciji kao kalibracijska otopina osim analita koji se određuje) i izračunata je standardna devijacija. Standardna devijacija množi se s tri da se dobije granica detekcije te s deset da se dobije granica kvantifikacije. Provedenim mjerenjima slijepe otopine utvrđena granica detekcije za određivanje ukupnog organskog ugljika u vodi metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije je 0,101 mg/l, a granica kvantifikacije 0,34 mg/l (tablica 5.4.1).

Tablica 5.4.1. Rezultati 15 uzastopnih mjerenja ukupnog organskog ugljika u slijepoj otopini, standardna devijacija te granica detekcije i kvantifikacije

Mjerenje (N)	TOC mg/l
1	0.110
2	0.106
3	0.111
4	0.043
5	0.102
6	0.026
7	0.095
8	0.067
9	0.085
10	0.091
11	0.034
12	0.072
13	0.084
14	0.067
15	0.000
Standardna devijacija	0.034
Granica detekcije (3x standardna devijacija)	0.101
Granica kvantifikacije (10 x standardna devijacija)	0.336

Izvor: Analitički laboratorij (Zavod za melioracije, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet)

6. Zaključak

Svrha ovog diplomskog rada bila je na temelju validacijskih pokusa procijeniti izvedbene značajke određivanja ukupnog organskog ugljika u vodama metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije, kako bi se izdvojili (prepoznali) koraci u analitičkom postupku koji značajno doprinose mjernoj nesigurnosti rezultata ispitivanja.

Za određivanje ukupnog organskog ugljika u vodi, pokazatelji validacije bili su preciznost (ponovljivost i obnovljivost), istinitost, linearnost, iskorištenje, granica detekcije i granica kvantifikacije. Mjerenje ukupnog organskog ugljika u vodama procijenjeno je u rasponu između 1-5 mg/l. Sva ispitivanja su provedena sukladno normiranim smjernicama za određivanje ukupnoga organskog ugljika i otopljenoga organskog ugljika u vodama.

Na temelju statističke obrade podataka dobivenih validacijskim pokusom dobiveni su prihvatljivi validacijski parametre za linearnost, a koeficijent korelacije bio je 0,998.

Za validacijske značajke preciznost i točnost relativna standardna odstupanja bila su manja od 5 %. Utvrđena su nešto viša, ali ipak prihvatljiva relativna standardna odstupanja pri višestrukim mjerenjima najnižeg standarda (1 mg/l).

Dobiveni rezultati validacije pokazuju da se metoda ispravno primjenjuje i da je prikladna za namijenjenu svrhu ispitivanja ukupnog organskog ugljika u vodama.

Međutim relativno široki raspon relativnih standardnih odstupanja u koncentracijskom području od 1 do 5 mg/l ukazuje da treba poduzeti mjere kako bi se smanjile pogreške i uvela poboljšanja u procesu ispitivanja što je kontinuirani izazov za analitičare u ispitnim laboratorijima.

7. Literatura

1. Assmann, C., Scott, A., Biller, D. (2017.). Drink. Water Eng. Sci, 10: 61-68.
2. ASTM D5173-15 (2015.). Standard Guide for On-Line Monitoring of Total Organic Carbon in Water by Oxidation and Detection of Resulting Carbon Dioxide. ASTM International.
3. Avramidis, P., Nikolaou K., Bekiari, V. (2015.). Agriculture and Agricultural Science Procedia 4. Str. 425-430.
4. Bajzek Brezak, B. (2018.). Kvalitetom do akreditacije, akreditacijom k izvrsnosti. Hrvatsko mjeriteljsko društvo. Zagreb.
5. Bekiari, V., Avramidis, P. (2013.). International Journal of Environmental Analytical Chemistry. 94: 65-76.
6. Benjamin, M. M. (2002.). Water chemistry. McGraw-Hill. Boston.
7. Borković, I. (2016.). Razvoj i validacija kromatografske metode za određivanje alendronata. Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb.
8. Clark, R. M., Boutin, B. K. (2001.). Controlling Disinfection By-Products and Microbial Contaminants in Drinking Water. EPA/600/R-01/110.
9. Doležal, D., Tomić, T. (2003.). Proceedings, XVII IMEKO World Congress.
10. Florescu, D., Iordache, A. M., Costinel, D., Horj, E., Ionete R. E., Culea, M. (2011.). Validation procedure for assessing the total organic carbon in water samples. National R&D Institute for Cryogenics and Isotopic Technologies. Cluj-Napoca.
11. Gašljević, V. (2010.). Biochemia Medica 20. Str. 57-63.
12. HRN EN 1484:2002 - Ispitivanje vode - Smjernice za određivanje ukupnoga organskog ugljika (UOU) i otopljenoga organskog ugljika (OOU) (EN 1484:1997).
13. HRN EN ISO/IEC 17025 (2007.): Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i umjernih laboratorija (ISO/IEC 17025:2005+Cor.1:2006; EN ISO/IEC 17025:2005+AC:2006
14. Inaba S., Takenaka, C. (2004.). Effects of dissolved organic matter on toxicity and bioavailability of copper for lettuce sprouts. Environment International 31: 603– 608.
15. IUPAC Technical Report (2002.). Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis, Pure Appl. Chem., Vol. 74, No. 5, pp. 835-855.
16. Kaštelan-Macan, M., Petrović, M. (2013.). Analitika okoliša HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. Denona. Zagreb.
17. Köhler, S. J., Buffam, I., Laudon, H., Bishop, K. (2008.). Climate's control of intra-

- annual and inter-annual variability of total organic carbon concentration and flux in two contrasting boreal landscape elements, *J. Geophys. Res.*, 113, G03012, doi:10.1029/2007JG000629.
18. Krivohlavek, A., Marinčić, S., Šmit, Z., Puntarić, D. (2005.). Procjena mjerne nesigurnosti pri određivanju benzena i njegovih derivata (btex). XIX. mjeriteljski simpozij, Opatija, 26.-28. rujan 2005.
 19. Lazarić, K. (2001.). Validacija analitičkih metoda, Hrvatsko mjeriteljsko društvo, Zagreb 2001. Str. 1-8.
 20. Leenheer, J.A., Croue, J.P. (2013.). Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology* 37(1): 18a-26a.
 21. Lopez, G. P., Buffoni, E., Gomes, J. L. V. Quero (2011.). Wide Spectra of Quality Control. In Tech
 22. Marinčić, S., Šabarić, J., Šmit, Z., Puntarić, D. (2005.). Osiguranje kvalitete rezultata ispitivanja. 9. stručni sastanak laboratorija za ispitivanje voda, Vinkovci.
 23. Mettler toledo (1995.). https://www.mt.com/hr/hr/home/library/know-how/process-analytics/thor_toc_faq.html#question_1. Pristupljeno 5. rujna 2019.
 24. Poulsen, Holst & Molin Christensen (1993.). Method evaluation and quality control of chemical measurement processes. The National Institute of Occupational. Copenhagen.
 25. Salminen, R. (2005.). FOREGS Geochemical Atlas of Europe. Euro Geo Surveys. Finland.
 26. Uredba o standardu kakvoće voda (2013.). Narodne novine br. 73.
 27. Visco, G., Campanella, L., Nobili, V. (2005.). *Microchemical Journal* 79 : 185-191.
 28. Zamberlin, Š., Antunac, N., Samaržija, D., Horvat, I., Mikulec, M., Kuliš, Z. (2005.). Osiguranje kvalitete rezultata analiza analitičkih mljekarskih laboratorija. *Mljekarstvo* 55 (2) 139-153.
 29. Zgorelec, Ž., Mesić, M., Bašić, F., Kisić, I., Butorac, A., Gašpar, I. (2007.). Utjecaj gnojidbe i biljnog pokrova na gubitak dušika vodom iz tla. Hrvatske vode, Zagreb.
 30. Zovko, M., Romić, M. (2011.). Soil contamination by trace metals: Geochemical behaviour as an element of risk assessment. *Earth and Environmental Sciences*. Ahmad Dar, Imran (ur.). Rijeka. InTech: 437-456.

ŽIVOTOPIS

Ana Ljubić rođena je 30.3.1995. godine u Koprivnici, a trenutno živi u selu Peterancu. Od 2010. do 2014. godine pohađala je Opću gimnaziju Fran Galović u Koprivnici. Nakon završetka srednje škole 2014. godine upisala je preddiplomski stručni studij Održivi razvoj smjer ekoinžinjerstvo na Međimurskom veleučilištu u Čakovcu kojeg je završila u rujnu 2017. godine. Nakon završenog preddiplomskog studija 2017. godine upisala se na diplomski studij Agroekologija na Agronomskom sveučilištu u Zagrebu. Razumije (B2), govori (B1) i piše (B2) engleski jezik te razumije, govori i piše (A1) njemački jezik. Posjeduje B kategoriju vozačke dozvole. Poznaje rad na računalu (Office, Solidworks, Photoshop i dr.). 2015. godine je završila tečaj za zvanje Vatrogasac i 2016. godine za zvanje Vatrogasac I. klase. Od srpnja 2013. godine predsjednica je Udruge mladih Peteranec, a od 2004. godine sudjeluje u folkloru u KUD-u Fran Galović Peteranec. Preko Student servisa radila je u raznim firmama poput Carlsberg-a, Podravke, Kaufland-a i drugih.